

197-198

5504(15)

动物学研究 1993, 14 (2): 197-198
Zoological Research

ISSN 0254-5853
CN 53-1040/Q

一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法

AN IMPROVED METHOD FOR ISOLATION OF ANIMAL MITOCHONDRIAL DNA

关键词: mtDNA, 碱变性提取法

Key words: mtDNA, Isolation by Alkaline Lysis

线粒体 DNA; 王文, 施立明

Q523.03

线粒体 DNA (mtDNA) 已被广泛用于动物群体遗传学和进化生物学的研究, 并取得了许多有意义的结果。有效的 mtDNA 提取方法无疑是开展这方面研究的前提。关于动物 mtDNA 的提取方法, 国内外已有不少报导。概括起来, 可分为: 1) 氯化铯超速离心法, 2) 柱层析法, 3) DNase 法, 4) 碱变性法。本文报道了一种改进的碱变性提取法, 与其它方法相比, 具有应用范围广、简便、经济等优点。

材料和方法 一、材料 本文以银额果蝇 (*Drosophila albomicans*) 成虫及鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、牛蛙 (*Rana catesbeiana*)、鹌鹑 (*Coturnix coturnix*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 的肝脏以及人的胎盘为实验材料, 有新鲜的材料, 也有液氮长期冻存 (-196°C)、普通冰箱冷冻室保存 (-10°C) 或以冰壶 (4°C) 短期内运送至实验室的材料。

二、溶液 SE 缓冲液或称匀浆缓冲液: 0.25 M 蔗糖, 30 mM Tris-HCl, 10 mM Na_2EDTA , 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.3-8.1。

溶液 I: TEN: 10 mM Tris-HCl, 10 mM Na_2EDTA , 0.15 M NaCl, pH 8.0;

或 GTE: 1% 葡萄糖, 25 mM Tris-HCl, 50 mM Na_2EDTA , pH 8.0。

溶液 II: 1% SDS 含 0.2 N NaOH (用时用 10% SDS 和 1N NaOH 新配制)。

溶液 III: KAc 溶液, 其中含 3M K, 5 M Ac。

三、操作程序 1. 取 2-15 g (视动物种类而定) 动物组织或整体于少量 SE 液中剪碎 (或研磨碎), 加约 50 ml SE, 以电动匀浆器 1500 r/min 上下匀浆 15 次 (有硬质的组织剪碎后先用纱布过滤, 再用匀浆器匀浆)。将匀浆物 1000 r/min 离心 10 min 取上清液 12000 r/min 离心 15 min, 沉淀即为线粒体。加 4 ml SE 液悬浮线粒体, 然后转至 4 个 1.5 ml Eppendorf 管, 每管 1 ml。

2. 12000 r/min 离心 8 min, 弃上清液。每管加 150 μl 溶液, 将沉淀吹打均匀后加 300 μl 新制的溶液 II, 混匀。冰浴 10 min, 各加 225 μl 冷溶液 III (4°C), 混匀。冰浴 25 min。

3. 12000 r/min 离心 6 min。取上清液, 加入半倍体积的水饱和酚, 室温振荡 15 min 后, 加原上清液 1/2 体积的氯仿-异戊醇 (24: 1), 充分混匀。

本文 1992 年 5 月 29 日收到, 同年 9 月 3 日修回。

4. 12000r/min 离心 8min, 取水相, 加等体积异丙醇或两倍体积无水乙醇混匀冰浴 30 min. 12000r/min 离心 10min, 用 70% 冷乙醇 (0℃) 洗涤沉淀。12000r/min 离心 2 min. 空或自然干燥, 加适量体积 TE (其中可含 20μg/ml DNase-free 的 RNase A) 溶解。

四、酶解和检测 按照常规的 DNA 酶解和检测方法进行。

结果与讨论 依照本法提取的各类动物的 mtDNA 酶切电泳图谱见图 1。果蝇成虫的 mtDNA 得率最高, 约为 1.5–2.0μg/g。鲤鱼、鹌鹑、鼠兔和牛蛙的肝脏约为 1.0μg/g。人胎盘得率约为 0.5μg/g。如用 RNase 处理, 可完全消除 RNA 的干扰 (图 1。鲤鱼和果蝇)。结合本实验室的其它工作, 看来, 本方法对于昆虫、鱼类、两栖类、鸟类以及哺乳类的各种组织均可获得满意的结果。

本法与 Tamura 等 (1988) 的方法基本相似, 但作了几点重要改进。

一、匀浆液的 pH 值有一个变动范围 (7.3–8.1) 而非固定的 7.5。一般而言, 在 pH7.3–8.1 范围内, 对于大多数动物材料来说都能得到质量较好的 mtDNA。但是有时有的动物却需要 pH 值偏高或偏低的 SE 液。例如, 在 pH7.5 时, 即便是新鲜的牛蛙材料提取的 mtDNA 也受到较严重的核 DNA 污染 (图 1。牛蛙₁)；而在 pH8.1 时, 即使从冰箱冻存材料提取的 mtDNA 核 DNA 污染也较少 (图 1 牛蛙₃)。根据我们的体会, 在试验某一新的材料时, 先用 pH7.6 的 SE 液, 如提取的 mtDNA 样品电泳检测后背景不清晰, 就改用 pH 值偏高的 SE 液; 如无 DNA 而只有 RNA, 就改用 pH 值偏低一些的 SE 液。

二、我们提出溶液 I 的两种配方, 以供具体应用时选择。采用 GTE 得率较高, 但对于某些材料, 提取的 mtDNA 会有核 DNA 污染。此时, 改用 TEN 则可提高样品的质量。如图 1 中牛蛙₂ 和牛蛙₃, 都是用冻存牛蛙肝提取的样品, 但在提取过程中, 牛蛙₂ 用的溶液 I 是 GTE, 而牛蛙₃ 是 TEN。很明显, 牛蛙₃ 背景比牛蛙₂ 清晰。

三、本法不需要严格的低温操作。除了复性时 (步骤 7) 要求冰浴外, 其它步骤均可在室温操作。

总之, 我们改进的 mtDNA 提取方法简便、快速、适用范围广, 对设备和试剂的要求都不高, 而得率和纯度都可满足 mtDNA 片段长度多态性分析的要求, 不失为一值得试用的 mtDNA 提取新方法。

王 文
Wang Wen

施立明
Shi Liming

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 昆明 650223)

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica 650223)

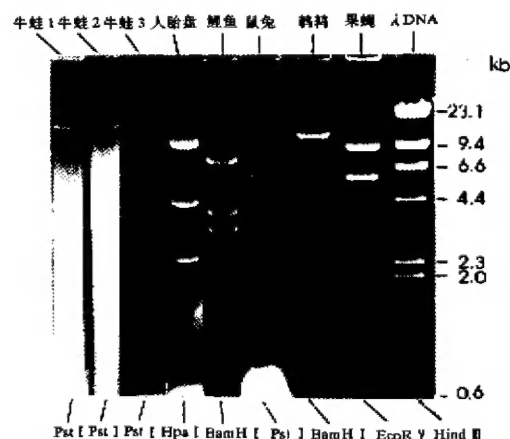


图 1 各种 mtDNA 酶切电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of digestions of mtDNA extracted from different animals

上端文字指明相应列 DNA 的来源。下端文字表示相应列所用的限制性内切酶。牛蛙₁ 和牛蛙₂ 是对照, 用以说明 SE 液的 pH 值和不同配方的溶液 I 对 mtDNA 样品质量的影响。鲤鱼和果蝇用 RNase A 处理过。人 DNA